

ACTIVIDAD AMEBICIDA DE EXTRACTOS DE TEJIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS SOBRE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Morales-Rubio ME, Morales-Vallarta MR, Treviño-Neávez JF, Garza-Padrón RA, Rodríguez-Garza RG, Mar-Aguilar F, Reséndez-Pérez D, Verduzco-Martínez JA, Cavazos-González R, Elizondo-Herrera A, y Barrón González MP*

Cuerpo Académico de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; C.P. 66451.

Autor de correspondencia: *porfi_bagzz@yahoo.com.mx

Nuestros antepasados se valieron de las plantas para hacer frente a diversas enfermedades, entre ellas las diarreicas, como es el caso de la amibiasis. La amibiasis es ocasionada por *Entamoeba histolytica*, afecta a 50 millones de personas a nivel mundial. En México representa un problema importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad. Para el tratamiento de la amibiasis la droga de elección es el metronidazol; sin embargo, recientes reportes indican que *E. histolytica* es resistente a esta droga. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevas moléculas de origen natural, que presenten menores efectos secundarios al humano. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad amebicida de los extractos metanólicos de callo (extractos de tejidos *in vitro*) y tallo (extractos de tejidos *in vivo*) de *Lophocereus schottii*, *Stenocereus gummosus*, *Astrophytum myriostigma* y de *Astrophytum capricorne*, evaluados en cultivos axénicos *in vitro* de *E. histolytica*. Para realizar dicha evaluación se emplearon dosis de 0.01, 0.05, 0.1, 0.13, 0.15, 0.25, 0.30 y 0.7 mg/mL de los extractos, se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y como control positivo se utilizó el metronidazol. Para cada dosis se dispuso de 12 tubos conteniendo 5 mL de medio PT, adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.05 mL de antibiótico, cada tubo se inoculó con 1×10^4 cel/mL e incubadas a 37°C por 4 días. Cada concentración se probó en tres eventos independientes por triplicado. Se procedió a contar el número de trofozoítos/mL, se graficaron los resultados mostrando el ANOVA $P < 0.05$ y se determinó el CI₅₀ mediante el análisis Probit. El extracto metanólico de *L. schottii* (callo) presentó mayor actividad antiamebiana en comparación con los extractos de callo evaluados de *S. gummosus*, *A. myriostigma* y *A. capricorne*; los cuatro extractos metanólicos de tallo evaluados, presentaron inhibición significativa con respecto al metronidazol. *L. schottii* (callo) presentó la CI₅₀ menor con 19.5 µg/mL para inhibir el crecimiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*. *L. schottii* (callo) representa una opción para la obtención de fitofármacos antiamebianos, al tratarse de extractos crudos.

Recibido: Abril 25 de 2010. Aceptado: Julio 1 de 2010

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica

La amibiasis es una enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal, ocasionada por el protozoario parásito *Entamoeba histolytica*, representa un problema de salud mundial y afecta principalmente a los países en vías de desarrollo, con mayor frecuencia en las regiones tropicales, con climas cálidos y

templados, con mayor orientación en las áreas pobres y mal saneadas en donde de forma habitual predomina la desnutrición, el hacinamiento, y un manejo inadecuado de las aguas en general y de las excretas, haciendo frecuente tanto la infección como la enfermedad, existiendo por lo tanto una fuerte correlación entre éstas condiciones y la frecuencia de la enfermedad. Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, ocupa el tercer lugar como causa de

muerte provocada por protozoarios, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100,000 muertes por año, la prevalencia de infección amibiana puede ser tan alta como 50% en ciertas áreas de los países en desarrollo. Tasas elevadas

de infección amibiana se reportan principalmente en la India, África y Centroamérica (Fig. 1); en México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Padilla-Raygoza, 1999).

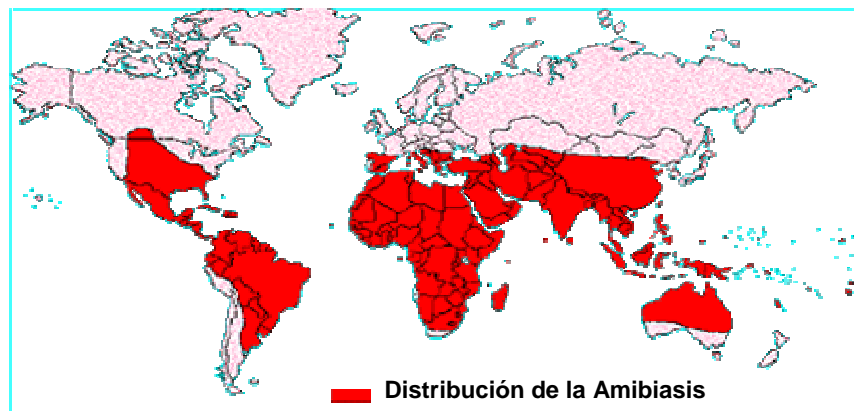


Figura 1.- Distribución mundial de la amibiasis.

La Organización Mundial de la Salud define a la amibiasis como la presencia de *Entamoeba histolytica* en el organismo, cause o no manifestaciones clínicas (WHO, 1997). La prevalencia de la amibiasis y sus manifestaciones es mayor en niños menores de 5 años, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 35-45 años asociándose con una alta mortalidad (Carreda-Bravo, 1989).

Para el tratamiento de la amibiasis, la droga de elección es el metronidazol, el cual se caracteriza por provocar muerte selectiva de procariotes y eucariotes. Es altamente eficaz contra todas las formas de amibiasis intra y extra intestinal. Su mecanismo de acción anti-protozoaria depende de su reducción química intracelular, en estas condiciones interactúa con el DNA y produce pérdida de la estructura helicoidal y rompimiento de las bandas, estas acciones inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y producen muerte celular. En cuanto a su vida media de excreción se absorbe bien a través de la mucosa gastrointestinal, se metaboliza en hígado y se elimina en orina; presenta vida media de 8 horas,

se prolonga a 18 horas en pacientes con enfermedad hepática. Por otra parte se ha demostrado en algunos estudios con ratones que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico (Legator *et al.*, 1975), y recientes investigaciones reportan la resistencia de la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* al metronidazol (Samarawickream *et al.*, 1997).

Algunos de los efectos secundarios de este medicamento en los pacientes que podrían llegar a presentarse son: meteorismo, cefalea, visión borrosa ocasional y pasajera, vómitos, diarrea, malestar estomacal, pérdida del apetito, sensación de sequedad de la boca; sabor metálico y desagradable, orina oscura o rojiza, sensación de lengua sarrosa (lanuda); irritación de la boca o de la lengua, adormecimiento o cosquilleo en las manos o pies, sarpullido (erupciones en la piel), prurito (picazón), congestión nasal, fiebre, dolor en las articulaciones; y algunas de las contraindicaciones que puede presentar el paciente son: hipersensibilidad, discrasias sanguíneas durante la lactancia. Además durante el tratamiento deberá evitarse el consumo de

bebidas alcohólicas ya que aumenta el efecto de los anticoagulantes orales y puede producir sangrados; además coadministrado con Disulfiram produce psicosis aguda o estado confusional; con barbitúricos induce falla terapéutica que acorta la vida del metronidazol.

Etnobotánica

A través de su historia, los seres humanos han encontrado en la naturaleza la satisfacción de sus necesidades básicas, comida, calzado, vestido, medios de transporte, sabores y olores, no menos importante, es el uso que desde tiempos remotos el hombre hizo de las fuentes naturales para curar sus afecciones (Cragg y Nexman, 1999a; Paolini, 1998).

Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, los cuales han existido por cientos de años. Estos sistemas continúan desarrollando actualmente un papel esencial en la salud (Paolini, 1998). La Organización Mundial de la Salud ha estimado que aproximadamente, el 80 % de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Cragg y Nexman, 1999a).

Un análisis de las prescripciones presentadas en farmacias de Estados Unidos arrojó en 1998 que alrededor del 25 % contienen extractos de plantas o principios activos derivados de ellas; por otra parte, no menos de 119 sustancias químicas, derivadas de 90 especies pueden ser consideradas de importancia actualmente en muchos países, de ellas, el 74 % fue descubierto como resultado de estudios químicos o aislamiento de los principios activos de plantas usadas en la medicina tradicional (Cragg y Nexman, 1999a).

La homeopatía, por solo citar un ejemplo se encuentra entre los métodos terapéuticos que al parecer controlan las defensas del organismo. Un estudio presentado en la revista *European Journal of Pharmacology* demostró que el producto homeopático *Silicea* estimula a los macrófagos que son parte del sistema inmune (Rodríguez y Laza, 2001).

Finalmente se puede plantear que las plantas medicinales son una fuente de obtención de

principios activos de marcada importancia en las investigaciones actuales. La naturaleza es una abundante fuente de fármacos, sin embargo, se estima que solo del 5 al 15 % de las aproximadamente 250,000 especies han sido estudiadas sistemáticamente por la presencia de compuestos bioactivos. La comunidad científica internacional ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas fuentes de principios activos a partir de plantas conocidas como potenciales. (Laza *et al.*, 2003).

Desde de los albores mismos de la civilización, las plantas han proporcionado medicinas a la humanidad. A lo largo de la historia, diversas culturas han legado a las generaciones posteriores los conocimientos acumulados sobre las plantas medicinales. Esta amplia información sirve ahora de base a gran parte de la medicina tradicional. Las plantas siempre han sido parte integral de la práctica de la medicina (Morón, 2002).

La palabra droga proviene de *drogge*, del antiguo idioma holandés y quiere decir “secar”, ya que los antiguos farmacéuticos, médicos y curanderos con frecuencia dejaban secar las plantas para usarlas como fármacos. Hoy en día, aproximadamente el 25 % de las medicinas que se recetan siguen siendo derivadas de las plantas (Fresle y Wolfheim, 1997).

Durante los últimos 20 años ha crecido en gran medida el interés acerca de las plantas medicinales en la sociedad occidental. Aunque a partir del siglo pasado, el empuje de la industria farmacéutica hizo que la curación fundamentada en el empleo de plantas fuese vista como una práctica primitiva e irracional, en décadas recientes tales ideas han experimentado un extraordinario resurgimiento. En la actualidad se realizan descubrimientos científicos que están confirmando el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal y su uso se está transformando en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados, de hecho, constituyen una fuente alternativa de tratamiento (García *et al.*, 2005).

Las poblaciones indígenas del país conocen las propiedades curativas de muchas especies, usándolas de forma permanente, sin embargo la


comprobación científica de su valor medicinal no se ha llevado a cabo (Lozoya, 1976).

Bravo y Sánchez, (1978), reportan una gran cantidad de compuestos químicos para los diversas especies de la Familia Cactácea, principalmente del grupo de los alcaloides, así

como también reportan sus múltiples usos en la medicina tradicional.

En la Tabla 1 se encuentra la distribución y fotografías de las especies empleadas en este trabajo.

Tabla 1. Descripción botánica de las cactáceas estudiadas en este trabajo.

Nombre científico	Descripción botánica
 <p data-bbox="267 850 381 882"><i>L. schottii</i></p>	<p data-bbox="470 667 1421 882">En cuanto a su distribución, según Bravo y Sánchez, (1978), es en el desierto Crasicaule que comprende el norte del estado de Sonora hasta Arizona; es una área donde abundan las cactáceas, de ahí el nombre de crasicaule, también se halla distribuida en el sur del desierto sarcófilo (donde abundan plantas con hojas carnosas) que comprende el tercio medio de la Península de Baja California y en el desierto arbocrassicaulescente que comprende el tercio inferior de la Península de Baja California y en menor grado en los valles de la selva baja caducifolia espinosa.</p>
 <p data-bbox="251 1186 397 1218"><i>S. gummosus</i></p>	<p data-bbox="470 955 1421 1228">Planta dominante en muchas zonas desérticas que tiene una distribución muy amplia en la Península de Baja California e islas adyacentes del Golfo de California, como: Isla Tiburón, Isla Tortuga e Isla Ángel de la Guarda. Se encuentra desde el norte de Ensenada, aparece en la región de Vizcaíno, Magdalena, Santa Rosalía, Bahía Concepción, San Ignacio, hasta un poco al norte de Todos Santos y La Paz. Ningún otro cacto ocupa una extensión mayor en la península. También se desarrolla en las franjas angostas de los litorales de Sonora desde El Desemboque hasta Cerro Prieto y norte de Sinaloa (Mercado y Granados, 1999; Bravo y Sánchez, 1978; Anderson <i>et al.</i>, 2001; León y Pérez-Navarro, 1997).</p>
 <p data-bbox="243 1480 430 1512"><i>A. Myriostigma</i></p>	<p data-bbox="470 1312 1421 1491">Se encuentra ampliamente distribuida en matorrales rosetófilos en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. En San Luis Potosí ha sido colectado por D. Gold, Meyrán y la autora en cerros cercanos a El Huizache y en Matehuala; en Coahuila, por Mieg y Lindsay, entre Saltillo y Eagle Pass; por Cowper, en el Cerro de la Bola; en Nuevo León, por la autora cerca de Doctor Arroyo; en Tamaulipas, por la autora, cerca de Jaumave y Tula. (Bravo y Sánchez, 1991).</p>
 <p data-bbox="243 1785 397 1816"><i>A. capricorne</i></p>	<p data-bbox="470 1638 1421 1753">Se encuentra en los estados de San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León. Ha sido anotada por Matuda y Schwarz de San Luis Potosí; por el ingeniero G. Aguirre Benavides, del Cerro de la Paila, Laguna de Mayrán y San Pedro de las Colonias, en Coahuila, y por la autora, entre Saltillo y Monterrey. (Bravo y Sánchez, 1991).</p>

Extracción con Solventes

El primer paso de la extracción es liberar y solubilizar los metabolitos secundarios a través de la extracción acuosa o con solventes. Esto puede ser hecho por una serie de extracciones, usando solventes de polaridad variable y creciente, los cuales actúan como el primer paso del fraccionamiento o usando un solo solvente “universal” como el metanol, el cual disuelve la mayoría de los productos naturales al mismo tiempo que los libera de la matriz celular. Los materiales insolubles tales como la fibra y otros precipitados, pueden ser removidos mediante filtración o centrifugación (Cannell, 1998).

Cultivo de Tejidos Vegetales y Producción de Metabolitos Secundarios

Dentro de la nueva era biotecnológica, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han alcanzado un grado de desarrollo, insospechado hace 20 años. En la actualidad estas técnicas tienen grandes aplicaciones en: agricultura, industria farmacéutica, alimentaria, ya que mediante éstas es posible realizar una propagación clonal de especies vegetales de importancia económica, o en vías de extinción, así como también la obtención de plantas resistentes a patógenos, y metabolitos secundarios aplicables a las industrias antes mencionadas (Karth, 1981).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos únicos para una planta, especie o familia dada, aunque no son imprescindibles para la vida del organismo, contribuyen a la adaptación de las especies a su entorno y a la supervivencia. Los metabolitos secundarios son reconocidos hoy como fuente de medicamentos: sedantes, antiinflamatorios, diuréticos, antivirales; constituyéndose en un negocio muy lucrativo dada las múltiples opciones de tratamiento que ofrece y a la seguridad que representa para el consumidor el uso de productos naturales (Abdelnour, 2006).

Pierik (1990), define el cultivo “in vitro” de plantas como: el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y

protoplastos de plantas. Se caracteriza porque: ocurre a microescala (sobre una superficie relativamente pequeña) optimiza las condiciones ambientales (nutritivas, hormonales, de luz y temperatura), es aséptico, puede inducir un patrón anormal de desarrollo lográndose así la inducción de callo, embriogénesis somática; y permite la manipulación genética al trabajar con células individuales y protoplastos.

Los explantes de casi cualquier parte de la planta o de la semilla pueden formar callo (masa indiferenciada de células), previa desinfección y colocación en el medio apropiado. Las auxinas en una concentración de moderada a alta son las sustancias primarias de crecimiento para inducir el callo. Como el IAA, el NAA, y el 2,4-D; también deben de suministrarse en cantidades menores las citocininas como la K y la BA (Hartman *et al.*, 1997).

Pierick (1990), recomienda que para la biosíntesis “in vitro” de sustancias se deben utilizar plantas seleccionadas para una elevada producción del metabolito, por lo que es recomendable saber que órgano de la planta es el que presenta mayor cantidad de la sustancia, para de él desarrollar el cultivo de callo. Una vez establecido el callo, se hace un cultivo de células en suspensión y de ahí se deberán seleccionar líneas celulares de alta productividad. Para optimizar la producción de metabolitos se pueden agregar al medio precursores o promotores del metabolito, así como el control de los factores físicos (luz, temperatura, agitación). Un factor relacionado directamente con la producción de metabolitos es la tasa de duplicación celular, si esta es alta la producción también lo será, por desgracia en vegetales es de 16 a 24 h, una alternativa sería modificar este factor.

Reinert y Yeoman (1982), hacen referencia de que los cultivos de células vegetales pueden acumular una serie de metabolitos secundarios como los polifenoles, alcaloides, esteroides y pigmentos y algunos de ellos se acumulan en el medio e inhiben el crecimiento, como los polifenoles. En sus investigaciones también recomiendan para ciertas especies el cultivo de callo para obtener metabolitos secundarios y para otras el cultivo de células en suspensión.

Piñol (1999), menciona que aunque existen problemas para la producción de metabolitos secundarios a través de la técnica de cultivos vegetales, como la baja productividad del compuesto deseado, esto se puede incrementar al elegir líneas genéticamente de alta productividad, o bien optimizando las condiciones físicas y químicas del cultivo. En Japón se ha producido “in vitro” en un biorreactor de 20,000 L una cantidad de ginseng que “in vivo” requeriría de 5 a 7 años y 600 ha de la planta para una producción similar. Mantell y Smith (1983), reconocieron la utilidad del sistema de cultivo de tejidos vegetales al servir como fuente de nuevas plantas y metabolitos de importancia económica para el hombre.

Actividad amebicida de plantas

González Garza *et al.* (2000), estudiaron la actividad antiprotozoaria de los extractos acuoso y metanólico de dos especies del género *Acacia* sobre cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, y comprobaron la actividad inhibitoria de los extractos acuosos de hojas en ambas especies, resultando para *A. farnesiana* un 67.5% de inhibición y para *A. rigidula* 58.4%, confirmando de esta manera su uso en la medicina tradicional como amebicida. Calzada Flores *et al.* (2001), lograron inhibir en un 50 % el enquistamiento de *Entamoeba invadens*, utilizando extractos de *Castela texana*. Barrón González (2007), trabajó con extractos metanólicos de *Castela texana* sobre *E. histolytica*, obteniendo una IC_{50} de 218.5 $\mu\text{g/mL}$.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la amibiasis es una de las afecciones ocasionadas por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*, que por su característica de ser cosmopolita afecta aproximadamente a 500 millones de personas a nivel mundial; México es considerado como el país con mayor cantidad de individuos infestados, por lo cual en este trabajo consideramos importante la validación con el método científico de la evaluación de los

extractos metanólicos de callo y tallo de *Lophocereus schottii*, *Stenocereus gummosus*, *Astrophytum myriostigma* y de *Astrophytum capricorne*. A pesar de que se han aislado y reportado algunos de los metabolitos producidos a partir de muchas plantas medicinales y de que existen evidencias de su utilización en medicina tradicional mexicana en la cura de diversas enfermedades, no se tienen suficientes estudios farmacológicos que puedan confirmar su valor terapéutico. Con éste trabajo nos propusimos caracterizar el efecto amebicida de los extractos metanólicos de las especies seleccionadas.

HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos obtenidos de callo y tallo de *Lophocereus schottii*, *Stenocereus gummosus* y *Astrophytum myriostigma* y de *Astrophytum capricorne* presentan actividad amebicida contra *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS cultivada bajo condiciones axénicas in vitro.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad amebicida del extracto metanólico de las especies seleccionadas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS empleando el medio PT bajo condiciones axénicas in Vitro.

Evaluar la actividad amebicida de los extractos metanólicos obtenidos de callos in vitro de *Lophocereus schottii* a concentración de .01, 0.05, y 0.13 mg/mL, *Stenocereus gummosus* a concentración de .01, 0.10, 0.15 y .30 mg/mL *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne* a concentración de 0.01, 0.1 y 0.7 mg/mL.

Evaluar la actividad amebicida de los extractos metanólicos de callo y tallo de *L. schottii* [0.01, 0.1, 0.15 y 0.3 mg/mL], *S. gummosus* [0.01, 0.1, 0.15 y 0.3 mg/mL], *A. myriostigma* y *Astrophytum capricorne* [0.01, 0.1 y 0.3 mg/mL].

Evaluar la actividad amebicida de los extractos metanólicos crudos de las especies seleccionadas empleando el análisis PROBIT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, Suero bovino, Extracto de hígado y páncreas (EHP), Especies vegetales: *Lophocereus schottii*, *Stenocereus gummosus* y *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*.

Preparación de los medios de cultivo

Se preparó el medio PT para el cultivo de amibas, como se describe a continuación: Se mezclaron todos los componentes de la Tabla 2 y se disolvieron en 31.25 mL de EHP y se aforaron a 250 mL con agua desionizada. El pH se ajustó a 7.00 con NaOH 10N, el medio se colocó en alícuotas de 10 mL en tubos para cultivo de 16 X 150 mm con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 Lb de presión a 121°C.

Tabla 2. Composición del medio PT.

COMPONENTES	CANTIDAD (para 250 mL)
-Peptona de caseína	5.00g
-Extracto de levadura	2.50g
-NaCl	0.50g
-L- Cisterna	0.50g
-Ácido ascórbico	0.05g
-K ₂ HPO ₄	0.25g
-KH ₂ PO ₄	0.15g
-Cittrato férrico amónico	0.000285g
-D- Glucosa anhidra	5.00g

Mantenimiento de Entamoeba histolytica cepa HM1-IMSS

La cepa se mantuvo mediante resiembras sucesivas, inoculando 10,000 trofozoítos/mL a

un tubo 16 X 150 mm con tapón de rosca, conteniendo 10 mL. de caldo PT adicionado con 0.1ml de solución de penicilina-estreptomocina y 1.0 mL. de suero bovino, la cepa fue incubada a 37°C por 72 horas. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto, se colocó en agua-hielo por 15 min. para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó 10 veces por inversión suave, y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

Cinética de crecimiento de Entamoeba histolytica

Se inocularon 24 tubos con medio de cultivo PT-caldo con volumen de 5 mL, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomocina y 0.5 mL. de suero bovino y un inoculo de 10, 000 trofozoítos/mL. Se incubaron a 37°C y a partir del día 1 cada 24 h. Se determinó el número de trofozoítos/mL a 2 tubos de cultivo hasta el día 6 de incubación.

Procesamiento del material vegetativo

El material vegetativo de las cactáceas, se procesó en el laboratorio de Micropropagación y de Fitoquímica. De las especies *L. schotti*, *S. gummosus*, *A. myriostigma* y *Astrophytum capricorne* se procedió a establecer un cultivo in vitro en medio Murashige y Skoog (1962), para el desarrollo de callo.

Cultivo in vitro (obtención de callo)

El medio de cultivo utilizado fue el Murashige & Skogg (MS) 1962 sólido, el cual se elaboró a base de sales minerales, con alta proporción de nitratos, compuestos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores de crecimiento disueltos en agua bidestilada, como

agente solidificante se usó Agar. El medio se esteriliza a 15 lb/15 minutos y después se almacena en refrigeración.

Obtención de extractos metanólicos a partir de plantas silvestres

Para la obtención de extractos se obtuvieron 30 g de material vegetativo (tallos) de las especies seleccionadas, este se maceró y se agregó a 100 mL de metanol (mayor polaridad) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se colocó en un agitador Dual Action Shaker Lab Line, por un periodo de 7 días, posteriormente el extracto se filtro sobre papel Wathman, No.1 y el solvente se evaporó con presión reducida con un Rotavapor Büchi 461 y luego por evaporación a temperatura ambiente se terminó de obtener el extracto.

Obtención de extractos metanólicos a partir de callo in Vitro

Para el tejido in vitro se pesó el callo, se maceró, se le agregó la proporción correspondiente de solvente y se siguió el mismo procedimiento anterior.

Preparación de solución madre

La solución madre o stock se preparó disolviendo 30 mg/mL del extracto metanólico

de cada uno de las especies a evaluar en 1.0 mL de DMSO y a partir de esta solución stock se tomaron las cantidades necesarias para obtener la concentración deseada.

Preparación de dosis

A partir de la solución madre de cada especie se emplearon las siguientes dosis: 0.01, 0.05 y 0.13 mg/mL de *L. schottii* (Callo), 0.01, 0.10, 0.15 y 0.25 mg/mL de *L. schottii* (Callo) y *S. gummosus* (callo y Tallo); 0.01, 0.10 y 0.30 mg/mL de *A. myriostigma* y *A. capricorne* (Tallo); 0.01, 0.10 y 0.70 mg/mL de *A. myriostigma* (Callo); 0.01, 0.10 y 0.30 mg/mL de *A. myriostigma* y *A. capricorne* (Callo y Tallo).

Evaluación de la actividad amebicida

Se dispuso de 12 tubos de 13 x 100 mm conteniendo 5 mL del medio de cultivo PT, suplementado cada uno con 0.05 mL de solución de Penicilina-Estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino, para posteriormente adicionar las concentraciones señaladas en la Tabla 4mg/mL de los extractos metanólicos de cada especie a evaluar, cada tubo se inóculo con 1x10⁴ trofozoítos/mL y posteriormente se incubaron a 37°C y se determinó en tres eventos independientes por triplicado el número de trofozoítos/mL a los 4 días de incubación.

Tabla 3. Tratamientos que presentan diferencia significativa con respecto al control positivo y el porcentaje de inhibición.

	Extracto metanólico de:	Concentración mg/mL	Rendimiento cel/mL	% de inhibición
-Control			178,125	-
-Metronidazol			73,125	-
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Tallo	0.30	417	99.76
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Tallo	0.10	10,750	93.96
<i>Astrophytum capricorne</i>	Tallo	0.70	1,875	98.94
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Callo	0.70	1,354	99.23
<i>Lophocereus schottii</i>	Callo	0.13	15,149	91.49

RESULTADOS

Evaluación de la actividad amebicida de los extractos metanólicos

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3, en la cual se observa que el testigo (cultivo normal de *E. histolytica*) presentó un rendimiento aproximado de 178,125 cel/mL, en el control positivo (metronidazol CI₅₀=0.111 µg/mL) se obtuvo un rendimiento de 73,125 cel/mL. En la Tabla 3 se muestran en orden ascendente los tratamientos cuyos rendimientos celulares presentaron diferencia significativa con respecto al control positivo (metronidazol

0.111µg/mL).

Evaluación de la actividad amebicida de los extractos metanólicos crudos empleando el análisis PROBIT

En la Tabla 4 se muestran ordenados de mayor a menor actividad amebicida, las CI₅₀ obtenidas para los extractos metanólicos de *L. schottii*, *S. gummosus*, *A. myriostigma* y *Astrophytum capricorne*. Los valores obtenidos fueron calculados a través del análisis Probit empleando las Tablas B y la ecuación $Y=mx+b$ y el paquete estadístico SPSS, versión 2007 para Windows.

Tabla 4. Actividad antiamebiana del extracto metanólico de las plantas seleccionadas.

Especie	Extracto metanólico de:	CI ₅₀ [µg/mL]
Metronidazol ^b		0.111
<i>Lophocereus schottii</i>	Callo	19.50
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Tallo	27.00
<i>Stenocereus gummosus</i>	Tallo	44.8
<i>Stenocereus gummosus</i>	Callo	74.00
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Callo	76.00
<i>Astrophytum capricorne</i>	Tallo	86.00
<i>Lophocereus schottii</i>	Tallo	165.50

DISCUSIÓN

Actualmente para el control de la amebiasis ocasionada por *Entamoeba histolytica* la droga de elección es el metronidazol, sin embargo existen reportes recientes en los cuales hacen mención de que *E. histolytica* desarrolló resistencia a esta droga sistémica (Samarawickream *et al.*, 1997), aunado a esto también se han reportado efectos mutagénicos en bacterias y efectos carcinogénicos en hamster, aunado a los múltiples efectos secundarios

indeseables que presentan el humano, tales como náuseas, vómito, sabor cobrizo, daño renal, entre otros (Legator *et al.*, 1975). En base a lo anterior, es inminente la búsqueda de nuevas drogas antiamebianas.

En base a estos resultados obtenidos se observa una marcada inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* en presencia del extracto metanólico de tallo de *A. myriostigma* a concentración de 0.30 mg/mL con un rendimiento de 417 cel/mL, lo cual representa una inhibición del 99.76%, al evaluar el efecto

del extracto metanólico del callo de *A. myriostigma* se obtuvo un rendimiento de 1,354 cel/mL y un porcentaje de inhibición de 99.23%, valor muy cercano al anterior. Al comparar el efecto inhibitorio del extracto metanólico de tallo y callo de *A. myriostigma* sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*, podemos constatar que no se aprecia diferencia significativa entre ambos extractos; el haber obtenido resultados tan similares entre el extracto metanólico obtenido del tallo y del callo, nos refuerza la idea propuesta por Pierick (1990), Reinert y Yeoman (1982), Piñol (1999), Kartha (1981) y Mantell y Smith (1983), quienes proponen que una de las alternativas para la obtención de metabolitos secundarios de una manera sustentable es el cultivo *in vitro*.

De acuerdo a los resultados obtenidos del extracto metanólico de callo de *L. schottii* (con un porcentaje de inhibición de 91.49 a concentración de 0.13 mg/mL), que nos demuestran una efectividad antiamibiana mayor que el extracto metanólico del tallo de la planta silvestre (porcentaje de inhibición 24.09 a una concentración de 0.15 mg/mL), corroborando así lo mencionado por Pierick (1990), Reinert y Yeoman, (1982), Piñol (1999), Kartha (1981) y Mantell y Smith (1983) que con el cultivo *in vitro* podemos optimizar los recursos y hacer uso de los mismos de una manera sustentable y se esta manera utilizar el recurso para la obtención de fitofármacos *in vitro* sin deteriorar los recursos naturales.

La inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* que mostró el extracto metanólico de callo de *L. schottii* fue de 91.49% a concentración de 0.13 mg/mL, este valor muestra diferencia significativa con respecto al control positivo (metronidazol).

De los extractos metanólicos de callo, la CI_{50} menor fue para *L. schottii* con un valor de 19.5 μ g/mL. Estos valores de CI_{50} son superiores al CI_{50} para el metronidazol ($CI_{50}=0.111$ μ g/mL), pero cabe recalcar que el metronidazol es una sustancia pura, y los valores de CI_{50} obtenidos en este trabajo con los extractos metanólicos es una mezcla de sustancias, las cuales en futuros trabajos se podría hacer la separación de sustancias puras y realizar el análisis, y

determinar si este efecto inhibitorio sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* es dado por la sinergia de varias de estas sustancias o bien de manera individual.

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de *L. schottii* (callo) presenta mayor actividad antiamibiana en comparación con los extractos de callo evaluados de *S. gummosus* y *A. myriostigma*.

L. schottii (callo) representa una opción para la obtención de fitofármacos antiamibianos, al tratarse de extractos crudos.

REFERENCIAS

- Abdelnour, A. 2006. Cultivos celulares para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de plantas. Boletín Ciencia y Tecnología. Costa Rica. 48:51.
- Anderson E, Barthlott W, Brown R. 2001. The cactus family. Editorial Timber Press, New York, pp. 55, 70, 645, 646.
- Bravo HH, Sánchez MH. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Autónoma de México: México D.F, pp 37, 70, 71, 72, 78 y 81, 105, 107, 108, 109, 138, 139, 140, 611-622.
- Bravo - Hollis H. y M.H. Sánchez. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. III Universidad Autónoma de México, México D.F. pp. 252 – 263.
- Bravo HH, Scheinvar L. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica: México D.F, pp 127. 161 y 162.
- Carreda-Bravo T., (1989). La amibiasis invasora como problema de salud pública. Biol. Med. Hosp. Infant. Mex; 46:139-148.
- Cannel RJP. 1998. Methods in Biotechnology. Vol. 4 Natural Products isolation. Glaxo Wellcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc: Totowa, N.J, pp 1-285.

- Cragg GM, Nexman DJ. 1999a. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation* 17(2):153-63.
- Fimbres PY, García R. 1998. Evaluación del efecto funguicida y bactericida de la mezcla de cactáceas *Pachycereus pecten-aboriginum* (cardón) y *Lophocereus schottii* (músaro). XXX Congreso Nacional de Microbiología. México, Abril 2-4.
- Fresle DA, Wolfheim C. 1997. Educación al público en uso racional de medicamentos: un estudio internacional. Programa de Acción sobre Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de Salud. Ginebra: OMS.
- García MAJ, Morón RF, Alonso CI, López PP, Ruiz SAK. 2005. Estrategia para lograr un uso racional de los medicamentos herbarios. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 10 (2).
- Hartman HT, Kester D, Davies F, Geneve R. 1997. *Plant Propagation: principles and practices*. Prentice Hall Editions: New Jersey, pp 564-570.
- Henrickson, J. 1972. A taxonomic revision of the Fouquieriaceae. *Aliso* 7(4): 439-537.
- Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation Methods and applications.
- Laza LD, Rodríguez LI, Sardina CG. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 8(3):1.
- Legator M.S., Connor T.H. and Stoeckel M., (1975). Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. *Science.*, 188:1118-1119.
- León L, Pérez-Navarro J. 1997. Advances in the botany of the Gulf of California islands, Baja California, Mexico. [internet] disponible en el sitio de red http://www.sdnhm.org/research/symposia/abst_g2o.html, Revisado el 8 de Noviembre del 2007.
- Lozoya, X. 1976. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. *Investigación y Ciencia*. 254:4-11.
- Mantell S.H, Smith H. 1983. *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press: London, pp. 3-9.
- Mercado BA, Granados SD. 1999. La pitaya. *Biología. Ecología. Fisiología sistemática. Etnobotánica*. Universidad Autónoma de Chapingo: México, pp 49.
- Morón RF. 2002. *Plantas medicinales y medicamentos herbarios*. Editorial Ciencias Médicas: La Habana, Cuba, pp. 195.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-97.
- Paolini M. 1998. Brussels sprouts: an exceptionally rich source of ambiguity for anticancer strategies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 152(2):293-4.
- Padilla-Raygoza N., (1999). Amibiasis en edad pediátrica, Cuarta Reunión de Expertos en amibiasis. SEARLE, Primera Edición 47-55.
- Pierick R.L.M. 1990. Cultivo “*in vitro*” de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, pp 292-294.
- Piñol, M.T. 1999. XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología y VI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal, Sevilla, España, Septiembre 22-24.
- Reinert J, Yeoman M. 1982. *Plant Cell and tissue culture, a Laboratory Manual*. Springer Verlag: New York, pp 47-55.
- Rico-Bobadilla AC, Gassós OLE, Felix FA. 2001. Efecto antimicrobiano del extracto liofilizado de músaro (*Lophocereus schottii*). XXXII Congreso Nacional de Microbiología, Guanajuato, Gto, México, Abril 3-5.
- Rodríguez I, Laza D. 2001. La información científica en homeopatía. *Resumed* 14(1):5-9.
- Samarawickream N. A., Brown D.M., Upcroft J.A., Thammapalerd N. and Upcroft P., (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Hemother.* 40:833-40.

Thorpe, T.A. Plant Tissue Culture. Methods and applications in Agriculture. Academic Press: Orlando, Florida, pp. 184-193.

WHO News and activities. Bulletin of the World Health Organization. 75 (3):22291-292, (2003).



“El abuelo” Retrato tarahumara a lápiz
Por Marco Antonio Juárez-Aguilar

Toctli – Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica
Es una publicación de Red CIB

ISSN 2007-3437



Red de Comunicación e Integración Biomédica

<http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB>

Cd. Juárez, Chih., México 2010.